

## Actividad enzimática e isoenzimática en la pared arterial de pacientes con arteriosclerosis

V. García Róspide\* - J. Jiménez Alonso\*\* - L. Salmerón Febres\* - R. Peñafiel Marfil\* - J. González Ríos\* - J. García Arcos\* - R. Sánchez Navarro\* - E. Ros Díe\*

Hospital Universitario.  
Ciudad Sanitaria. Granada (España)

### RESUMEN

Se estudia la actividad enzimática arterial y sérica de lactodeshidrogenasa (LDH, EC 1. 1. 1. 27.), creatin-kinasa (CK, EC 2. 7. 3. 2.), aspartato aminotransferasa (AST, EC 2. 6. 1. 1.), alanin aminotransferasa (ALT, EC 2. 6. 1. 2.), gamma-glutamyltransferasa (G.G.T, EC 2. 3. 2. 2.) y fosfatasa alcalina (FA, EC 3. 1. 3. 1.) así como las isoenzimas de LDH (LDH-1, LDH-2, LDH-3, LDH-4 y LDH-5) y CK (CK-BB, CK-MB y CK-MM) en 51 pacientes con arteriosclerosis y 50 sujetos sanos. La actividad arterial de ALT, GGT y FA es muy baja (0-30 U/g de proteína) en ambos grupos. La actividad de AST es de 200-300 U/g de proteína, también en ambos grupos. Las enzimas musculares (LDH y CK) se encuentran significativamente más elevadas ( $p < 0.001$ ) en arterias arterioscleróticas respecto de las sanas, pero su actividad desciende mucho más de lo normal en arterias calcificadas. En pacientes con arteriosclerosis desciende la actividad arterial de LDH-3 ( $p < 0.001$ ) y la LDH-5 aumenta ( $p < 0.001$ ). La actividad de las isoenzimas CK-BB es del 99-100 % de la actividad CK total, tanto en el grupo arteriosclerótico como en el grupo control. Estos hallazgos podrían servir como marcadores indirectos de la progresión de la arteriosclerosis.

**Palabras clave:** Pared arterial, aterosclerosis, lactodeshidrogenasa, creatin-kinasa, aspartato aminotransferasa, isoenzimas LDH, isoenzimas CK.

### SUMMARY

Arterial and serum activities of lactate dehydrogenase LDH, EC 1. 1. 1. 27) creatine kinase (CK, EC 2. 7. 3. 2.), aspartate aminotransferase (AST, EC 2. 6. 1. 1.), alanine aminotransferase (ALT, EC 2. 6. 1. 2.), gamma-glutamyltransferase (GGT, EC 2. 3. 2. 2.) and alkaline phosphatase (AP, EC 3. 1. 3. 1.), LDH isoenzymes (LDH-1, LDH-2, LDH-3, LDH-4 and LDH-5) and CK isoenzymes (CK-BB, CK-MB and CK-MM) were studied in 51 patients with and 50 patients without atherosclerosis. Arterial ALT, GGT and AP activities were very low (0-30 U/g protein) in both atherosclerotic and control groups. Arterial AST activity was 200-300 U/g protein. Muscular enzymes (LDH and CK) were significantly higher ( $p < 0.001$ ) in atherosclerotic than in control arteries, but were lower in calcified atherosclerosis. In patients with atherosclerosis, LDH-3 activity was decreased ( $p < 0.001$ ) and LDH-5 activity was increased ( $p < 0.001$ ) in the atherosclerotic wall. CK-BB isoenzyme activity was 99-100 % of the total CK activity in all patients in both atherosclerotic and control groups. These findings may be an indirect marker of atherosclerotic progression.

**Key words:** Arterial wall, atherosclerosis, lactate dehydrogenase, creatine kinase, aspartate aminotransferase, LDH and CK isoenzymes.

### Introducción

Aunque la causa exacta de la arteriosclerosis no se conoce todavía, las últimas teorías señalan que son los cambios morfológicos y/o funcionales del endotelio vascular los primeros pasos en el desarrollo de la enfermedad. Según esto una de las más importantes hipótesis del desarrollo de la arteriosclerosis propone que son varios estímulos los que pueden dañar las células endoteliales iniciándose así el proceso

\* Servicio de Cirugía Vascular.

\*\* Servicio de Medicina Interna.

arteriosclerótico (1). La síntesis y liberación de factores de crecimiento desde las células endoteliales, macrófagos, células de músculo liso (*cml*) y plaquetas juegan un papel muy importante en el origen de la arteriosclerosis.

El hecho de que la proliferación de músculo liso también tiene lugar en lugares donde la capa endotelial permanece intacta indica que otras células implicadas en la formación de la placa arteriosclerótica (monocitos, macrófagos, células endoteliales y *cml*) pueden ser responsables de la producción y migración de los factores de crecimiento. Las plaquetas pueden llegar a ser preactivadas y liberar parte de su contenido en zonas del endotelio morfológicamente intactas pero con su función alterada.

Debido a que la hipertrofia de las *cml* es uno de los factores más importantes en la patogénesis de la arteriosclerosis, nuestro grupo ha medido las actividades de varias enzimas e isoenzimas de la pared arterial de sujetos sanos y las ha comparado con las de los pacientes con arteriosclerosis, observando que la variación más importante se producía en las enzimas musculares.

## Material y métodos

Estudiamos las actividades de las enzimas lacto-deshidrogenasa (LDH, EC 1. 1. 1. 27.), creatin-kinasa (CK, EC 2. 7. 3. 2.), aspartato aminotransferasa (AST, EC 2. 6. 1. 1.), alanin aminotransferasa (ALT, EC 2. 6. 1. 2.), gamma-glutamilttransferasa (GGT, EC 2. 3. 2. 2.) y fosfatasa alcalina (AP, EC 3. 1. 3. 1.), así como las isoenzimas de LDH (LDH-1, LDH-2, LDH-3, LDH-4 y LDH-5) y las de CK (CK-BB, CK-MB y CK-MM) en el suero y pared arterial (arteria pudenda externa) de 51 pacientes con arteriosclerosis (37 hombres,  $x \pm SD$  66.9  $\pm$  13.4 años y 14 mujeres, 63.2  $\pm$  12.8 años) y 50 pacientes con arterias sanas extraídas de pacientes varicosos (19 hombres de 44.1  $\pm$  14.7 años y 31 mujeres de 44.7  $\pm$  13.9 años) que sirvieron como grupo control.

Este estudio fue aprobado por el Comité ético de nuestro Hospital.

## Muestra arterial

De cada paciente se extraía un segmento arterial

de 3-4 cm de longitud y se dividía en dos partes que se colocaban separadamente en 50 mM de solución de Pipes (fijador y bufer) a pH 7 (piperacin-N, N'-bis 2-ácido etanosulfúrico, Sigma, ref. p-6757). El pKa es de 6.8 a 25° C.

Uno de los segmentos se estudió en el Laboratorio de Anatomía Patológica y clasificado como normal o patológico según las pruebas de hematoxilina-eosina, tricómico de Masson y orceína de Unna.

El segundo segmento se usaba para el estudio de la actividad enzimática en el laboratorio de Bioquímica. Las muestras se maceraban y se centrifugaban a 4.000 r.p.m. durante 10 min., determinándose inmediatamente después las actividades enzimáticas del homogenado y suero, siguiendo los métodos siguientes:

1. Método de *Bergmeyer* para la determinación de LDH, AST y ALT (2-4).
2. Método de *Szasz* para la determinación de CK y GGT (5, 6).
3. Método de *Bessey, Lowry y Brock* para la determinación de AP (7).

El método *Bradford* (8) se usó para la determinación de proteínas.

La determinación de las isoenzimas de LDH y CK se realizó con el método *Paragon* de los Laboratorios Beckman (9-11), basado en la diferente motilidad electroforética de las isoenzimas.

Se empleó el método de la *t* de *Student* para la comparación de medias de muestras independientes. También se emplearon los coeficientes de correlación para la comparación de las actividades enzimáticas séricas y arteriales.

Las actividades de las muestras arteriales se expresan en U/g de proteína y las del suero en U/L. Se consideró una diferencia significativa una  $p < 0.05$ .

## Resultados

### Actividades enzimáticas en la pared arterial

Las actividades de ALT, GGT y AP fueron muy bajas en la pared arterial (0-30 U/g de proteína) tanto en el grupo arteriosclerótico como en el control. Además, no se encontraron diferencias significativas

entre ambos grupos en ninguna de estas enzimas. La actividad arterial de AST fue de 200-300 U/g de proteína en todos los casos, aunque tampoco se encontraron diferencias significativas. En cambio, sí se encontró una diferencia significativa en la actividad arterial de la LDH y CK.

Tanto en los hombres como en las mujeres la actividad de las enzimas musculares (LDH y CK) fue significativamente más elevada ( $p < 0.001$ ) en las arterias arterioscleróticas respecto de las sanas (Figs. 1 y 2).

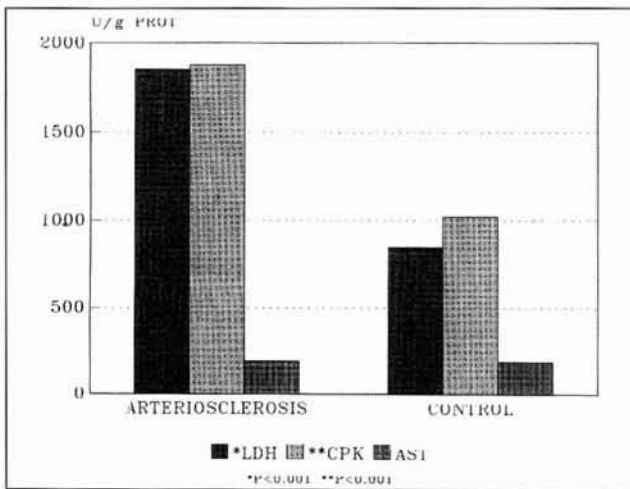


Fig. 1. Actividad enzimática arterial en pacientes arterioscleróticos y controles sanos de edad similar.

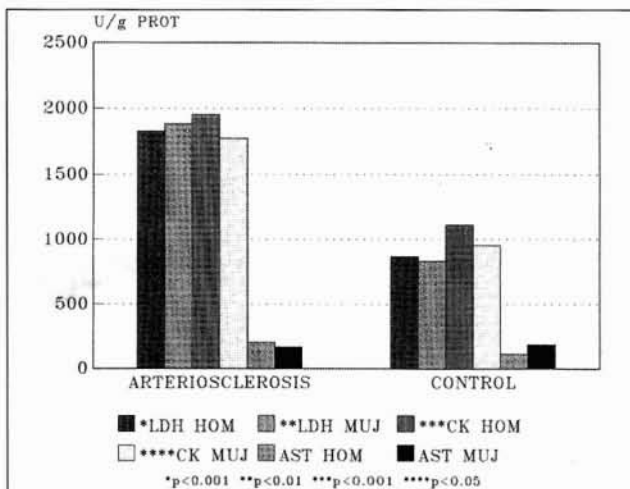


Fig. 2. Actividad enzimática arterial en hombres y mujeres, arterioscleróticos y controles, de edad similar.

La actividad enzimática de LDH y CK arterial se incrementa con la edad, aunque estos cambios no son estadísticamente significativos. Sin embargo, en pacientes con una edad superior a 80 años se encontró un descenso significativo de la LDH y CK en pared arterial ( $p < 0.001$ ) (Fig. 3).

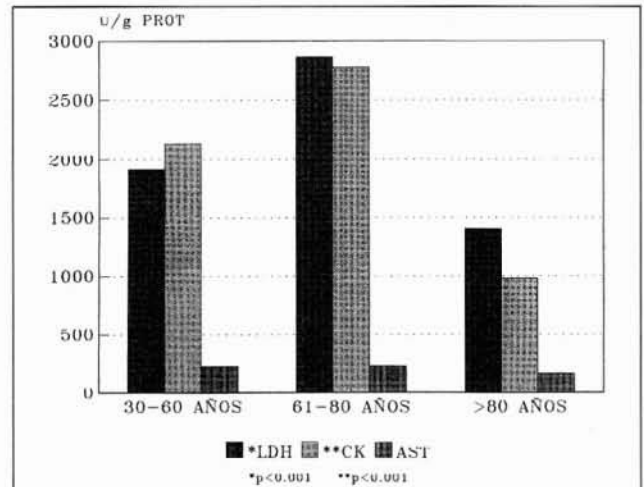


Fig. 3. Actividad enzimática arterial del grupo arteriosclerótico en diferentes edades.

También comparamos la actividad de LDH y CK en arterias arterioscleróticas con y sin calcificación. El primer grupo mostró un descenso significativo de la LDH ( $p < 0.01$ ) y CK ( $p < 0.001$ ) (Fig. 4).

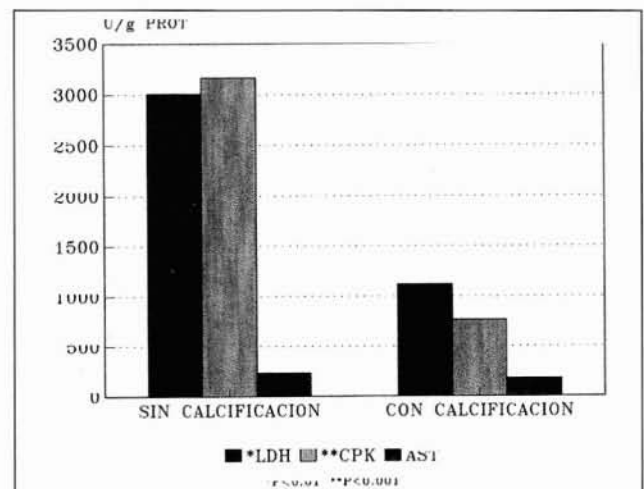


Fig. 4. Actividad enzimática en arterias con y sin calcificación.

La actividad de la LDH y CK se incrementa con la edad, debido posiblemente a un incremento de las *cml*, pero sólo lo hace hasta que aparecen calcificaciones arteriales, normalmente en pacientes con edades muy avanzadas.

No se encontró ninguna correlación significativa entre la actividad enzimática sérica y arterial de LDH, CK, AST, ALT, GGT y AP, tanto en el grupo arteriosclerótico como en el control.

### Actividades de las isoenzimas LDH

Las actividades de las isoenzimas de LDH se expresa en % del total de LDH. En pacientes con arteriosclerosis se encontró un descenso significativo ( $p < 0.001$ ) de la actividad de LDH-3 y un incremento significativo de LDH-5 ( $p < 0.001$ ) en la pared arterial en comparación con la actividad de la pared sana (Fig. 5). Estos resultados podrían reflejar cambios metabólicos debidos a la hipertrofia de las *cml* en la pared arterial arteriosclerótica.

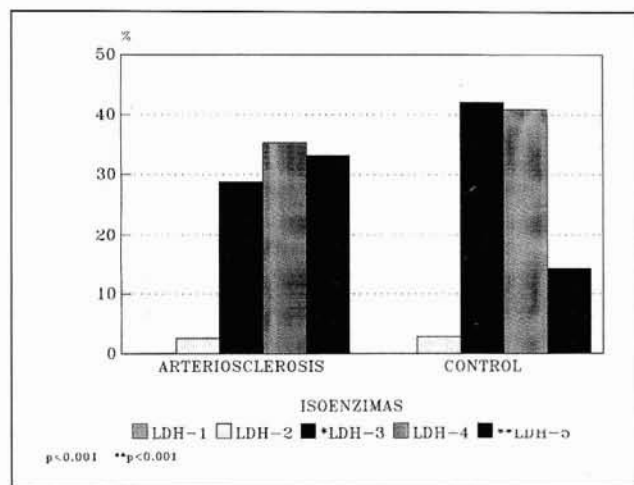


Fig. 5. Actividad isoenzimática arterial en pacientes arterioscleróticos y controles sanos de edad similar.

### Actividad de las isoenzimas CK

La actividad arterial de la isoenzima CK-BB fue de 99-100 % de la actividad total de CK en todos los casos (grupo arteriosclerótico y control). Las isoenzimas CK-MB y CK-MM presentaron una actividad de 0-1 %.

### Discusión

En 1986 (1) se publicó un estudio sobre los últimos avances de la patogenia de la arteriosclerosis, pero apenas existen trabajos sobre la actividad enzimática en la pared arterial y todavía menos en pacientes vivos. Nuestros hallazgos sobre el incremento de la LDH y CK totales en la pared arterial de los pacientes con arteriosclerosis sugieren que estos cambios pueden estar relacionados con la proliferación de las *cml*. Esta proliferación ocurre probablemente durante el proceso aterosclerótico, por lo que es de esperar que la actividad enzimática de la LDH y CK arterial vaya incrementándose con la edad. Se ha visto que después de los trasplantes arteriales carotídeos se encuentra una actividad elevada de LDH en el tejido trasplantado, así como en la carótida adyacente (12). La actividad permanece constante durante el seguimiento, probablemente porque la arteriosclerosis no avanzó durante este período.

Cuando este proceso conduce a la calcificación de la pared arterial se observa en nuestros estudios un descenso significativo de LDH y CK debido a la sustitución de las células de músculo liso por calcio, o a la calcificación de estas células que quedarían inactivas. Remes V. A. y col. (13) encontraron que la LDH arterial también disminuía en áreas que sufrían un trauma quirúrgico, por ejemplo en las zonas de clampaje.

Gown y Benditt (14) estudiaron las isoenzimas de LDH en las placas ateroscleróticas humanas. De acuerdo con estos autores, las placas fibrosas ateroscleróticas presentan, en muchos casos, un carácter monoclonal y constituye una base razonable para una hipótesis similar entre estas lesiones y las neoplasias. Estos mismos autores también estudiaron la relación isoenzimática LDH-5/LDH-3 encontrando, como nosotros, en las placas ateroscleróticas un marcado incremento de esta relación, es decir un aumento significativo de la LDH-5 con respecto a la LDH-3. Estos autores no encontraron diferencias significativas en esta relación cuando se trataba de placas de diferentes tamaños, por lo que dedujeron que los cambios de la LDH reflejaban una modificación fenotípica en las células de músculo liso, rechazando la teoría de que estos cambios podrían deberse al descenso de la presión de  $O_2$  en la capa muscular de la pared arterial (15). Los niveles isoenzimáticos de



LDH en las placas ateroscleróticas podrían servir, por lo tanto, como marcador que permitiría distinguir las *cml* de la placa de ateroma de las de la media o las de la íntima engrosada, aunque los cambios no sean tan severos como para considerar que se ha producido una aterosclerosis.

Marcadores similares que incluyen posiblemente los empleados en los estudios sobre el desarrollo de las neoplasias de hígado de ratas (16) pueden dar información útil. Por ejemplo, en la rata las lesiones iniciales se identifican sólo por alteraciones enzimáticas de la glucosa-6-fosfatasa o adenosin-trifosfatasa (17).

Wilhelm y colaboradores (18) demostraron que la fracción LDH-3 es la que presenta una mayor actividad en la aorta humana normal, pero que si la arteria sufre cambios arterioscleróticos la máxima actividad de LDH corresponde a la fracción LDH-5. Nuestros resultados están en la misma línea, ya que encontramos una actividad máxima de LDH-3 en las arterias normales del grupo control y un máximo de actividad de LDH-4 y LDH-5 en arterias arterioscleróticas. Más aún, observamos un incremento significativo de LDH-5 arterial en los pacientes arterioscleróticos respecto de los sujetos sanos y un descenso significativo de la LDH-3 en la pared arterial arteriosclerótica comparada con las arterias sanas. Estos resultados pueden reflejar un metabolismo muy alterado en las arterias con arteriosclerosis ya que la LDH-5 es la isoenzima más resistente a los cambios metabólicos.

En este estudio también se observó que la actividad isoenzimática de CK-BB en la pared arterial era del 99-100 % de la actividad CK total, sin que hubiera variaciones por la presencia o ausencia de arteriosclerosis o calcificaciones, por tratarse de hombres o mujeres, o por diferencias de edad. Este valor es mucho mayor que el obtenido por Wilhelm (18) en un estudio de la actividad isoenzimática CK en las aortas de cadáver humano y de rata.

La fosfatasa alcalina (AP), una enzima localizada en las superficies absorptivas, se relaciona con el transporte de sustancias a través de la pared celular, aunque no se ha demostrado que tome parte en la «absorción» de lípidos en la pared arterial durante el proceso arteriosclerótico.

Las *cml* pueden emigrar desde la media a la íntima y acumular allí grasas. Por esta razón y por la

localización de la fosfatasa alcalina en la membrana celular de las células de músculo liso (19), esta enzima puede ser responsable en parte de la «absorción lipídica» en la pared vascular.

La baja actividad de AP en la pared arterial en nuestro estudio (0-40 U/g de proteína), junto con el nulo incremento de actividad durante el desarrollo de la arteriosclerosis, puede reflejar la lentitud en el proceso de acumulación lipídica en las *cml* a diferencia de lo que sucede en los animales de experimentación, donde los incrementos de actividad AP en la pared arterial pueden ser detectados en 6 meses (20). Remes V. A. y cols. (12) observaron que la actividad AP era más alta en la parte interna de la adventicia. Otro estudio (21) demostró que la actividad arterial de AP variaba dependiendo del calibre y espesor de la arteria. Sin embargo, otros autores encuentran que la actividad era más elevada en las arterias finas y pequeñas (22). Nuestros resultados están de acuerdo con los de Strobl-Jagër y cols. (21), ya que encontramos una actividad enzimática muy disminuida en arterias pequeñas (arteria pudenda externa). En las grandes arterias con signos de arteriosclerosis este autor observó un incremento de la actividad AP en la adventicia. Sin embargo, como estos resultados fueron obtenidos de cadáveres, es decir de arterias que han sufrido alteraciones metabólicas severas, se contradicen con los resultados de Seifert (23), ya que este autor observó que los vasos con importantes cambios metabólicos mostraban un descenso significativo de la actividad AP. Esto llevó a sugerir a Seifert que la actividad AP está relacionada con el metabolismo celular más que con fenómenos de absorción. El metabolismo de las arterias estudiadas por nosotros estaba probablemente alterado por el proceso arteriosclerótico, y esto puede explicar la baja actividad AP del presente estudio.

En conclusión, encontramos un incremento de la actividad total de LDH y CK en la pared arterial arteriosclerótica, comparado con el grupo de arterias sanas. Este incremento puede estar relacionado con la hipertrofia de las *cml*. La actividad de LDH y CK desciende en la pared arteriosclerótica calcificada debido, posiblemente, a la sustitución de las *cml* por calcio.

Cuando progresa la enfermedad arteriosclerótica se incrementa la actividad de la isoenzima LDH-5 a expensas de la LDH-3, posiblemente porque la pri-

mera es más resistente a las condiciones metabólicas extremas. Este resultado puede ser un marcador indirecto de la progresión de la arteriosclerosis.

## BIBLIOGRAFIA

1. ROSS, R.: The pathogenesis of atherosclerosis. An update. *N. Engl. J. Med.*, 1986, 314: 488-500.
2. BERGMAYER, H. U.: Methods of enzymatic analysis. *Academic Press*. New York, 1974, 2: 574-89.
3. BERGMAYER, H. U.: Method of AST enzymatic analysis. *Clin. Chem.*, 1978, 24: 58.
4. BERGMAYER, H. U.; HORDER, M.: Methods of ALT enzymatic analysis. *Clin. Chem. Acta*, 1980, 105: 247 F.
5. SZASZ, G.; GRUBER, W.; BERUT, E.: A method for serum creatin-kinase determination. *Clin. Chem.*, 1976, 22: 650.
6. SZASZ, G.: A kinetic photometric method for serum gamma-glutamyl transpeptidase. *Clin. Chem.*, 1969, 15: 124-36.
7. BESSEY O. A.; LOWRY, O. H.; BROOK, M.: A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.*, 1946, 164: 321-9.
8. BRADFORD, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, 72: 284-54.
9. WILKINSON, J. H.: The diagnostic value of LDH isoenzymes in clinical medicine. *Clinical profile*, Vol. I, Beckman Instruments, Inc, Fullerton, CA, 1968.
10. OPPER, A. W.; COLLIER, C. S.; MILLER, J. M.: Rapid electrophoretic method for the determination of the isoenzymes of serum lactate dehydrogenase. *Clin. Chem.*, 1966, 12: 308-313.
11. CAWLWY, L. P.: Electrophoresis and immunoelectrophoresis, Little, Brown and Co, Boston, 1969.
12. REMES, V. A.; VON SMITTEN, K. A.; RAEKALLIO, J. A.: Enzyme histochemical studies on microarterial grafts in rats. *Scand. J. Plast. Reconstr. Sur. Hand Surg.*, 1989, 23: 81-87.
13. REMES, V. A.; VON SMITTEN, K. A.; WARIS, T. H.; RAEKALLIO, J. A.: Assessment of microvascular clamping injury of rat aorta by histochemical examination of oxidoreductases. *Microsurgery*, 1990, 11: 95-101.
14. GOWN, A. M.; BENDITT, E. P.: Lactate dehydrogenase (LDH) isozymes of human atherosclerotic plaques. *Am. J. Pathol.*, 1982, 107: 316-21.
15. LINDY, S.; TURTO, H.; VITTO, J.; GARBARSCHE, C.; HELIN, P.; LORENZEN, I.: The effect of chronic hypoxia on lactate dehydrogenase in rabbit arterial wall: Biochemical studies on normal and injured aortas. *Atherosclerosis*, 1974, 20: 295-301.
16. WILLIAMS, G.: The pathogenesis of rat liver cancer caused by chemical carcinogens. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1980, 605: 167-189.
17. FARBER, E.: The sequential analysis of liver cancer induction. *Biochem. Biophys. Acta*, 1980, 605: 149-166.
18. WILHELM, A.: Topochemical variation of lactic dehydrogenase and creatin kinase isoenzyme patterns in aorta. *Artery*, 1980, 8: 362-367.
19. CHIU-YIN KWAN, HIROYUKI ITO: Acid and alkaline phosphatase activities in vascular smooth muscle: Species differences and subcellular distribution. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1987, 87: 367-72.
20. KUKREJA, R. S.; BHARDWAJ, J. R.; DATTA, B. N.; CHACRAVARTI, R. N.: Aortic enzyme alterations in experimentally induced atherosclerosis in rhesus monkeys. *Indian J. Med. Res.*, 1984, 79: 260-7.
21. STROBL-JAGER, E. V.; FIRBAS, W.; SINZINGER, H.: A method of semiquantification for determining the alkaline phosphatase activity in human vascular tissue. *Acta Histochem*, 1985, 76: 105-112.
22. KWUAN, C. Y.: Elevated alkaline phosphatase activity in cardiovascular tissues of spontaneously hypertensive rats. *IRCS Med. Sci.* 1983, 11: 690-1.
23. SEIFERT, H. W.: Alkalische Phosphatase und Ultrastruktur der Hautkapillaren. *Med. Dis.*, 1970, 29: 432-8.

## Agradecimiento

Agradecemos al Dr. L. Barrios por la ayuda prestada en las determinaciones enzimáticas.